多酶级联催化鹅脱氧胆酸合成熊脱氧胆酸

郑明敏，李春秀*，许建和*

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室，上海 200237. chunxiuli@ecust.edu.cn

熊胆粉作为保健食品和药品已经被使用了近千年。熊脱氧胆酸(Ursodeoxycholic acid, UDCA)是熊胆粉(需求量约为 45 吨/年)的主要活性成分，广泛用于脂肪性肝病、药物性肝炎、病毒性肝炎等胆汁淤积性肝病。7β-羟基甾醇脱氢酶(7β-HSDH, hydroxysteroid dehydrogenase)是双酶偶联法(图 1)催化鹅脱氧胆酸(Chenodeoxycholic acid, CDCA)转化合成熊脱氧胆酸的关键瓶颈酶，其活性、稳定性以及辅酶亲和力均显著影响酶促生物转化路线的技术经济性。我们通过基因挖掘手段获得一个新酶 7β-HSDH$_{Rt}$。然而，迄今报道的所有 7β-羟基甾醇脱氢酶大多具有活性低、稳定性差以及工作 pH 与 7α-HSDH 不相容等共同缺陷，从而导致目标产物 UDCA 的时空产率十分有限[1]。因此，采用酶工程技术大幅度提高相关酶的催化性能是决定生物技术能否拯救黑熊的关键所在。

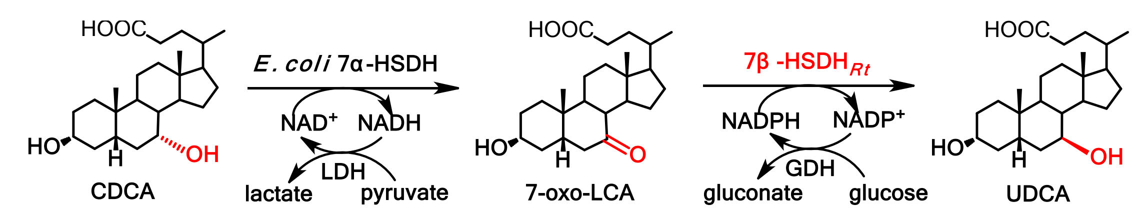


图 1. 多酶级联催化鹅脱氧胆酸(CDCA)手性反转合成熊脱氧胆酸(UDCA).

在此报告中我们提出了一种多目标共进化策略(**MODE**, multiobjective directed evolution)，用于改造 7β-羟基甾醇脱氢酶的催化活性、热稳定性和最适 pH 值[2]。通过易错 PCR、DNA shuffling 和定点突变等方法，最终所得突变体 $V_{3\text{-}1}$ 的比活力比野生酶高 5.5 倍，而半衰期延长 3 倍。此外，突变体的最适 pH 向弱碱性移动(pH 6.5→pH 7.5)，从而更接近于前置酶 7α-HSDH 所催化脱氢反应的酸碱度(pH 8.0)。使用上述共进化的突变酶 $V_{3\text{-}1}$ 进行级联转化反应时，UDCA 的时空产率达到 942 g L^{-1} d^{-1}，显著高于天然酶的 141 g L^{-1} d^{-1}。由此可见，酶催化剂的蛋白质工程改造技术在提高酶的催化合成潜能，促进生物催化工艺在绿色化工制药领域的应用，以及在服务生态文明建设、推动环境保护和生态平衡等方面，均将发挥强大的威力。

[1] Zheng, M.M.; Wang, R.F.; Li, C.X.; Xu, J.H. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 598–604.
[2] Zheng, M.M.; Chen, K.C.; Wang R.F.; Li, H.; Li, C.X.; Xu, J.H. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 1178–1185.